

## 咪唑键合细胞色素 c 的核磁共振双共振研究

邵伟平 魏金华 唐雯霞\*

(南京大学配位化学研究所, 南京, 210008)

我们用  $^1\text{H}$  NMR 双共振技术测定了在  $\text{pH}=7.04$ , 温度  $303\text{--}319\text{ K}$  范围内咪唑键合氧化型细胞色素 c 的平衡常数, 从 Van't Hoff 和 Arrhenius 方程得到键合的热力学常数  $\Delta H^\circ=48.5\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\Delta S^\circ=184\text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$  和活化能  $E_a=159\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 并与其它血红素蛋白和模型化合物的热力学常数作了比较和讨论. 用饱和转移法归属了  $\text{cyt c}\cdot\text{Im}$  的血红素环上甲基峰, 首次用 NMR 方法确证咪唑在与氧化型  $\text{cyt c}$  反应中取代了轴向 Met 80, 形成新的  $\text{Fe—N}$  键.

关键词: 细胞色素 c, 核磁共振, 反应热力学, 咪唑.

细胞色素 c ( $\text{cyt c}$ ) 是呼吸链中的一种电子转移蛋白<sup>[1,2]</sup>, 晶体结构分析表明血红素基团位于球状蛋白的空穴中, Fe 原子位于卟啉环平面上, 在其上下分别与咪唑 ( $\text{Im}$ )  $\text{N}(\text{His } 18)$  和  $\text{S}(\text{Met } 80)$  配位<sup>[3]</sup>. 在中性溶液中氧化型  $\text{cyt c}$  的  $\text{Fe—S}(\text{Met } 80)$  键较弱, 能被外加的配体如  $\text{ON}^-$ ,  $\text{N}_3^-$ , 吡啶,  $\text{F}^-$  等配基取代<sup>[4-6]</sup>. 为了阐明轴向配体在  $\text{cyt c}$  蛋白折叠中的作用以及轴向配体对金属蛋白氧化还原电位及电子传递性质的影响, 本文首次用  $^1\text{H}$  NMR 方法研究了咪唑与  $\text{cyt c}$  的反应, 观察到反应中  $\text{Fe—S}(\text{Met } 80)$  键断开, 新  $\text{Fe—N}(\text{咪唑})$  键形成, 并测得了不同温度下反应的平衡常数, 反应速率及热力学常数, 并与其它血红素蛋白及模型化合物和咪唑反应的热力学常数作了比较和讨论.

## 实 验

马心细胞色素 c (VI) 为 Sigma 公司产品, 并按文献[7]方法纯化.  $\text{cyt c}$  溶解在  $\text{pD}$  为 7.10 的咪唑  $\text{D}_2\text{O}$  溶液中,  $30^\circ\text{C}$  下反应 12 h, 经冻干后, 样品溶于 99.80% 的  $\text{D}_2\text{O}$  中, 用少量浓  $\text{DCl}$  和  $\text{NaOD}$  调  $\text{pD}$  至 7.04 ( $\text{pD}$  直接从  $\text{pH}$  计读数, 未经同位素校正). 最后  $\text{cyt c}$  浓度为  $7.6\times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , 咪唑为  $0.12\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , 使体系中  $\text{cyt c}$  及其与咪唑配合物 ( $\text{cyt c}\cdot\text{Im}$ ) 的浓度比约为 1:1.

饱和转移差谱按通常方法在 Bruker AM-500 NMR 仪上得到. 细胞色素 c 中卟啉环上第八位甲基 ( $\text{HM-8}$ ) 的自旋晶格弛豫时间  $T_1$  用反转-恢复法测得. 化学位移以二氧六环 (3.743 ppm) 为内标.

测定和计算  $\text{Im}$  与  $\text{cyt c}$  反应的速率常数和平衡常数的原理如下: 假设  $\tau_{\text{cyt c}}$ ,  $\tau_{\text{cyt c}\cdot\text{Im}}$  和  $M_z^{\text{cyt c}}$ ,  $M_z^{\text{cyt c}\cdot\text{Im}}$  分别是  $\text{cyt c}$  和  $\text{cyt c}\cdot\text{Im}$  的寿命和磁化强度,  $M_0^{\text{cyt c}}$  和  $M_0^{\text{cyt c}\cdot\text{Im}}$  是磁化强度的热平衡值. 饱和  $\text{cyt c}\cdot\text{Im}$  的某个峰时, 与其对应的  $\text{cyt c}$  上的峰的磁化强度与时间的关系由方程(1)决定:

$$\frac{dM_z^{\text{cyt c}}}{dt} = \frac{M_0^{\text{cyt c}} - M_z^{\text{cyt c}}}{T_1^{\text{cyt c}}} - \frac{M_z^{\text{cyt c}}}{\tau_{\text{cyt c}}} + \frac{M_z^{\text{cyt c}\cdot\text{Im}}}{\tau_{\text{cyt c}\cdot\text{Im}}} \quad (1)$$

对  $M_z^{\text{cyt c} \cdot \text{Im}}$  也有类似方程.  $T_1^{\text{cyt c}}$  是没有 Im 时, cyt c 的自旋晶格弛豫时间. 当 cyt c·Im 的某个峰存在而达到稳态时

$$\frac{dM_z^{\text{cyt c}}}{dt} = 0 \quad M_z^{\text{cyt c} \cdot \text{Im}} = 0$$

代入方程(1)并简化得:

$$\frac{M_z^{\text{cyt c}}}{M_0^{\text{cyt c}}} = \frac{\tau_{\text{cyt c}}}{T_1^{\text{cyt c}} + \tau_{\text{cyt c}}}$$

根据  $\tau_{\text{cyt c}}/\tau_{\text{cyt c} \cdot \text{Im}} = M_0^{\text{cyt c}}/M_0^{\text{cyt c} \cdot \text{Im}}$ , 得  $\tau_{\text{cyt c} \cdot \text{Im}} = M_0^{\text{cyt c} \cdot \text{Im}}/M_0^{\text{cyt c}} \cdot \tau_{\text{cyt c}}$

因此,  $M_z^{\text{cyt c}}/M_0^{\text{cyt c}}$ ,  $M_0^{\text{cyt c}}/M_0^{\text{cyt c} \cdot \text{Im}}$  可根据最低场分辨很好的血红素卟啉环上甲基峰在饱和与未饱和时强度之比求得. 反应速率常数  $k_1$ ,  $k_{-1}$  和平衡常数  $K$  由下式求得:



$$k_1 = \frac{1}{\tau_{\text{cyt c}} \cdot [\text{Im}]} \quad (3)$$

$$k_{-1} = \frac{1}{\tau_{\text{cyt c} \cdot \text{Im}}} \quad (4)$$

$$K_{\text{app}} = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad K = K_{\text{app}} \left[ 1 + \frac{[\text{H}^+]}{k_a} \right] \quad (5)$$

## 结果与讨论

氧化型 cyt c 在 315 K, pD=7.04 条件下的超精细位移区的 NMR 谱见图 1a. 在 32.54, 30.25 和 11.02 ppm 处的峰分别为 cyt c 分子中环卟啉 8,3,5 位甲基(HM-8, HM-3, HM-5)的共振峰. 图 1b 为 cyt c+Im 体系的同一区域的 NMR 谱, 谱中除出现游离 cyt c 的 HM-8, HM-3 和 HM-5 外, 尚出现属于 cyt c·Im 的新峰. 当用第二射频脉冲预饱和 cyt c+Im 体系中 cyt c 的 HM-8 共振峰时, 若反应方程(2)中的 cyt c 和 cyt c·Im 的寿命接近核磁共振的时间范畴, 即

$$\tau_{\text{cyt c}}, \tau_{\text{cyt c} \cdot \text{Im}} \approx \frac{1}{\omega_{\text{cyt c}} - \omega_{\text{cyt c} \cdot \text{Im}}}$$

则与其发生化学交换的 cyt c·Im 的 HM-8 的共振也有一定饱和(即饱和转移), 强度亦有一定衰减(图 1c), 该现象在其与当预饱和脉冲放在非共振区, 并在同样条件下得到的谱(图 1b)的差谱(图 1d)中更明显. 这样根据饱和转移差谱就能确定 cyt c·Im 的 HM-8 峰为 24.17 ppm, 用同样方法由图 1e, 1f 的饱和转移差谱可把 cyt c·Im 谱中 17.46 与 13.47 ppm 共振峰归属为 cyt c·Im 的 HM-3 和 HM-5 峰. 预饱和 cyt c 的与 Fe 直接配位的 Met 80 的甲基质子峰 -21.28 ppm, 在 1.99 ppm 处得饱和转移峰(图 2a), 但转移峰在甲基氨基酸残基的共振峰区, 为区别此峰为 cyt c·Im 分子中非配位 Met 80 的峰或配位 Met 80 的甲基的 NOE 峰, 用同样条件预饱和纯 cyt c 的配位 Met 80 得到的谱(图 2b)在 1.99 ppm 无 NOE 峰, 表明图 2a 中 1.99 ppm 峰为 cyt c·Im 分子中非配位 Met 80 的甲基峰, 该共振频率和无规则线团中 Met 残基  $\varepsilon_{\text{CH}}$  峰的 2.13 ppm 相近, 说明 cyt c·Im 中 Met 80 已被 Im 取代, 并远离 Fe 卟啉, 原来由于与 Fe(III)配位引起的共振中的顺磁贡献已接近消失.

cyt c 和 cyt c·Im 的寿命、磁化强度比及由此按式(3)–(5)计算得到的不同温度下反应的速率常数和平衡常数列于表 1 中. 随着温度的增加, 正反应速率常数、逆反应速率常数及平

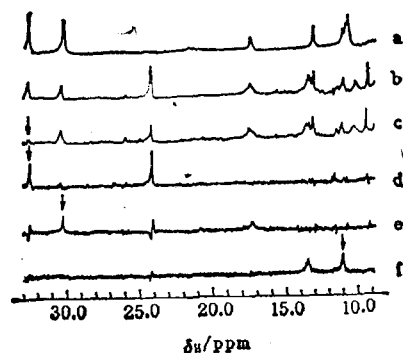


图1 在  $T=315\text{K}$ ,  $pD=7.04$  下超精细位移区的  $^1\text{H}$  NMR 谱

a. cytc 的 NMR 谱 ( $c_{\text{cytc}}=6.3\times 10^{-3}\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ );  
b. cytc+Im 体系的 NMR 谱 ( $c_{\text{cytc}}=7.6\times 10^{-3}\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{Im}}=0.12\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , 使体系中 cytc 和 cytc·Im 浓度比约为 1:1); c. 预饱和和 cytc+Im 体系中 cytc 的 HM-8 峰所得的谱; d. 预饱和和 cytc+Im 体系中 cytc 的 HM-8 峰的饱和转移差谱; e. 预饱和和 cytc+Im 体系中 cytc 的 HM-3 峰的饱和转移差谱; f. 预饱和和 cytc+Im 体系中 cytc 的 HM-5 峰的饱和转移差谱

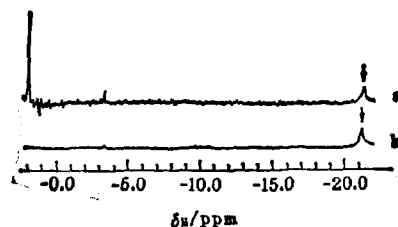


图2 在  $T=319\text{K}$ ,  $pD=7.04$  下超精细位移区 NMR 差谱

a. 预饱和和 cytc+Im 体系中 cytc 的 Met 80 甲基所得的饱和转移差谱; b. 预饱和和 cytc 样品中 Met 80 甲基所得的饱和转移差谱

衡常数增加。在  $303\text{K}$  时测得的平衡常数与 Schejter<sup>[8]</sup> 用分光光度法在  $305\text{K}$  得到的结果不一致, 是由于测定的离子强度不同, 亲合力的明显增加估计来源于高盐浓度对蛋白质结构的扰动<sup>[9]</sup>。平衡常数和速率常数与温度的关系根据 Van't Hoff 和 Arrhenius 方程得到:

$$\ln K = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \left( \frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

$$\ln k_1 = -\frac{E_a}{R} \left( \frac{1}{T} \right) + \ln A$$

图3为  $\ln K$  和  $\ln k_1$  对  $1/T$  作图。用线性回归法拟合得到了反应的热力学常数

$$\Delta H^\circ = 48.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1} \quad R = 0.989$$

$$\Delta S^\circ = 184 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$$

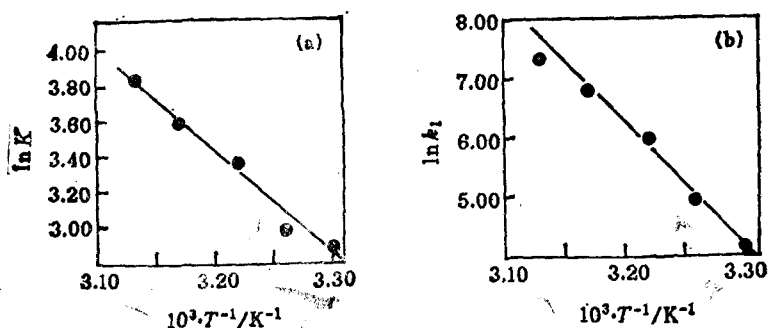
$$E_a = 159 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1} \quad R = 0.994$$

与其它血红素蛋白及模型化合物与咪唑反应(表2)比较, cytc 对咪唑的亲合力比 FeTPPO1 和 Hemin c 小 3—4 个数量级, 比 Met HbA 和鸽子 Met Hb 小 1 个数量级, 与

表1 不同温度下咪唑键合 cytc 的  $k_1$  和  $K$  值

$T/\text{K}$	$\frac{M_{\text{cytc}}}{M_{\text{O}^{\text{cytc}}}}$	HM-8*		$\frac{M_{\text{cytc}\cdot\text{Im}}}{M_{\text{O}^{\text{cytc}\cdot\text{Im}}}}$	HM-8**	$k_1$	$k_{-1}$	$K_{\text{app}}$	$K$
		$T_1/\text{ms}$	$\tau/\text{ms}$		$\tau/\text{ms}$				
303	0.806	56.9	237	0.839	289	33.9	3.46	9.80	17.8
307	0.600	71.5	108	0.660	144	74.8	6.95	10.8	19.5
311	0.348	71.2	38.0	0.502	74.6	211	13.4	15.8	28.6
315	0.230	56.7	17.0	0.369	41.7	474	24.0	19.7	35.8
319	0.172	47.0	9.78	0.377	30.8	822	32.5	25.3	45.9

\* cytc; \*\* cytc·Im.

图3 咪唑键合 cyt c 的  $\ln K$  和  $\ln k_1$  与温度  $T^{-1}$  的关系

鳐鲸 Met Mb 和人 Met Hb 相近, 这与它们的热力学常数有关. cyt c 与咪唑反应的  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  均大于 0, 尽管  $\Delta H^\circ > 0$  不利于反应向正方向进行, 但  $\Delta S^\circ > 0$  弥补了  $\Delta H^\circ$  的负作用, 结果是使反应向正方向进行, 说明 cyt c 对 Im 的亲合力来自正的熵变. 而其它血红蛋白及模型化合物与咪唑反应的  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  均小于 0, 说明对平衡常数的贡献来自负的  $\Delta H^\circ$  值.

表2 各种血红蛋白及模型化合物与咪唑反应的热力学常数

类 型	$K_{app}/\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$	$K/\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$	$\Delta H^\circ/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta S^\circ/\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	文 献
鳐鲸 Met Mb	36.6 <sup>a,b</sup>				[10]
Ferri Mb	2.20 ± 0.3 <sup>a,c</sup>		-17.1 ± 2.9	-16.6 ± 12.5	[11]
人 Met Hb	96 <sup>a,d</sup>				[12]
Met Hb A		204 <sup>a,e</sup>	-15.9 ± 2.1		[13]
鸽子 Met Hb		170 <sup>a,e</sup>	-5.0 ± 2.5		[13]
Hemin c	1 × 10 <sup>6(a,f)</sup>		-46.0	-37.4	[14]
FeTPPCL		6.3 × 10 <sup>4(a,g)</sup>	-46.0	-58.1	[15]
马心细胞色素 c		17.8	48.5	184	本文

a. 分光光度法; b. pH=7.0,  $t=25^\circ\text{C}$ ,  $I=0.11$ ; c.  $t=25^\circ\text{C}$ ,  $I=0$  (外推); d. pH=6.0,  $t=22^\circ\text{C}$ ; e.  $t=20^\circ\text{C}$ ; f.  $t=25^\circ\text{C}$ ; g.  $t=25^\circ\text{C}$ , 溶剂 DMSO.

影响血红蛋白与咪唑键合反应的  $\Delta H$  和  $\Delta S$  的因素是多方面的. 一般说血红蛋白的肽链折叠为血红素辅基提供了相对疏水的环境, 相当于辅基处在低介电常数介质中<sup>[16]</sup>. 低极性环境使血红素与咪唑键合反应的  $\Delta H$  趋负值<sup>[16]</sup>. 据此, cyt c 应和表 2 所列其它血红蛋白与咪唑反应一样, 其  $\Delta H$  值均应为负值. 但是, 由于咪唑和 cyt c 的血红素 Fe 配位需取代与 Fe(III) 配位的 Met 80, Fe—S 键断裂不仅引起 Met 80 远离 Fe, 疏水腔中, Leu 68, Leu 64, Ile 57, Leu 94 等残基的位置发生变化, 而且导致含 Met 80 的肽链片断 79—85 位移<sup>[17]</sup>, 造成比其它 Met-Hem 蛋白和咪唑键合更大构象变化 [在后一类蛋白中, 咪唑取代配位 H<sub>2</sub>O 和 Fe 键合, 仅引起疏水腔中远端 His(E7) 及其它组成疏水腔的氨基酸残基的位移<sup>[18]</sup>], 结果使  $\Delta H$  具有更大正值, 因此, 咪唑键合引起 cyt c 构象变化对  $\Delta H$  的贡献大于低极性环境对咪唑和血红素基的静电作用贡献导致反应的  $\Delta H$  为正值, 降低了咪唑与 cyt c 的亲合力.

cyt c 与咪唑反应的  $\Delta S$  为正值也不同于表 2 中其它血红蛋白反应的相应值. 这和配体与血红蛋白键合引起疏水腔结构失序程度有关<sup>[4,6]</sup>. 由于咪唑与 cyt c 键合使 Fe—S 键断裂, 疏水腔失序程度大于其它血红蛋白, 使 cyt c 和咪唑反应的  $\Delta S$  值比其它血红蛋白反应

的相应值更趋正值。

此外, cyt c 对咪唑的亲合力较小, 与正反应的活化能 ( $E_a = 159 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) 有关, 较高的活化能说明要生成 cyt c·Im 配合物必须打破较强的键。

### 参 考 文 献

- [1] Dickerson, R. E.; Geis, I., "The structure and Action of Proteins", Harper and Row, New York, 1969.
- [2] Kamen, M. D.; Dus, K. M.; Flatmark, T.; de Klerk, H., "Electron and Coupled Energy Transfer in Biological Systems", Vol. 1, Marcel Dekker, New York, 1971.
- [3] Dickerson, R. E.; Takano, T.; Eisenberg, D.; Kallai, O. B.; Samson, L.; Cooper, A.; Margoliash, E., *J. Biol. Chem.*, **1971**, *246*, 1511.
- [4] Blumenthal, D. C.; Kassner, R. J., *J. Biol. Chem.*, **1980**, *255*, 5859.
- [5] Sutin, N.; Yandell, J. K., *J. Biol. Chem.*, **1972**, *247*, 6932.
- [6] Huang, Y. P.; Kassner, R. J., *J. Biol. Chem.*, **1981**, *256*, 5327.
- [7] Williams, G.; Moore, G. R.; Porteous, R.; Robinson, M. N.; Soffe, N.; Williams, R. J. P., *J. Mol. Biol.*, **1985**, *182*, 409.
- [8] Schejter, A.; Aviram, I., *Biochemistry*, **1969**, *8*, 149.
- [9] Uchida, H.; Heystek, J.; Klapper, M. H., *J. Biol. Chem.*, **1971**, *246*, 6843.
- [10] Goldsack, D. E.; Eberlein, W. S.; Alberty, R. A., *J. Biol. Chem.*, **1966**, *241*, 2653.
- [11] George, P.; Hanania, G. I. H.; Irvine, D. H.; Abu-Issa, I., *J. Chem. Soc.*, **1964**, 5689.
- [12] Klapper, M. H.; Uchida, H., *J. Biol. Chem.*, **1971**, *246*, 6849.
- [13] Beeston, J. G.; Epega, A. A.; Irvine, D. H., *J. Chem. Soc. (A)*, **1968**, 1346.
- [14] Goff, H.; Margan, L. O., *Inorg. Chem.*, **1976**, *15*, 2069.
- [15] Ciaccio, P. R.; Ellis, J. V.; Munson, M. E.; Kedderis, G. L.; McConville, F. X.; Duclos, J. M., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1976**, *38*, 1885.
- [16] Blumenthal, D. C.; Kassner, R. J., *J. Biol. Chem.*, **1979**, *254*, 9617.
- [17] Tang, W. X.; Concar, W.; Moore, G. R.; Williams, R. J. P., "第25届国际配位化学会议论文摘要集", Nanjing, 1987, 第646页.
- [18] Deatherage, J. F.; Loe, R. S.; Anderson, C. M.; Moffat, K., *J. Mol. Biol.*, **1976**, *104*, 687.

## <sup>1</sup>H NMR Double Resonance Study of Imidazole Binding to Cytochrome c

Shao, Wei-Ping Wei, Jin-Hua Tang, Wen-Xia\*

(Institute of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing, 210008)

### Abstract

Kinetic and equilibrium data for the binding of imidazole to horse heart ferricytochrome c at temperature range of 303—319 K were determined at pH=7.04 by using <sup>1</sup>H NMR double resonance method. From Van't Hoff and Arrhenius equations, the observed thermodynamic parameters for imidazole binding are  $\Delta H = 48.5 \text{ kJ/mol}$ ,  $\Delta S = 184 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$ ,  $E_a = 159 \text{ kJ/mol}$  and were compared with those of other ferric hemoproteins and model complex. The reason of lower affinity of cytochrome c for imidazole was discussed. Saturation transfer experiments were used to assign the resolved hyperfine-shifted resonances of ferricytochrome c·Im to heme ring methyls. That the imidazole binds to iron by displacing the axial coordinated Met 80 was first confirmed by NMR.